

О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ СЫРЬЯ НА ЭКСТРАКЦИЮ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ ИЗ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Изучено влияние термической обработки порошков корневищ с корнями сабельника болотного на содержание в них биологически активных веществ. Выдерживание сырья при температуре 70°C в течение 7 дней приводит к снижению содержания в корневищах с корнями сабельника болотного неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов на 40%. Происходит постепенная деполимеризация высокомолекулярных проантоцианидинов с постепенным накоплением проантоцианидинов, имеющих более низкие степени полимеризации, вплоть до мономеров, которые являются более доступными для экстракции. Поэтому проведение термической активации порошков корневищ с корнями сабельника болотного позволяет увеличить степень извлечения высокомолекулярных проантоцианидинов.

Термическая обработка сырья не приводит к качественным изменениям состава проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного.

Ключевые слова: сабельник болотный, проантоцианидины, экстрагируемые и неэкстрагируемые проантоцианидины.

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация и количественное определение проантоцианидинов в растительных объектах связаны с определенными трудностями: сложным строением проантоцианидинов, одновременным присутствием в растениях нескольких проантоцианидинов с различной степенью полимеризации, различным строением мономерных звеньев. В процессе хранения лекарственного растительного сырья может происходить полимеризация или деполимеризация проантоцианидинов. Поэтому при стандартизации растительного сырья проводят определение суммы проантоцианидинов или фракции проантоцианидинов с определенным интервалом степени полимеризации [1, 2].

Олигомеры проантоцианидинов, содержащих от двух до шести катехиновых единиц, растворимы в воде, водных растворах спиртов. Полимеры со степенью полимеризации от 7 и выше в воде практически нерастворимы [3, 4]. В растениях, как правило, одновременно находятся мономеры, димеры, тримеры, далее образующие тетрамеры, пентамеры, гексамеры, гептамеры, высокомолекулярные цепи проантоцианидинов [2].

Провести полное извлечение проан-

тоцианидинов из растительного сырья не представляется возможным: фракция высокомолекулярных проантоцианидинов составляет неэкстрагируемую сумму [5, 6].

Содержащиеся в коре деревьев проантоцианидины защищают древесину от повреждения вредителями. Так, в коре некоторых деревьев содержание неэкстрагируемых проантоцианидинов изменяется от 0,6 до 3%, что составляет 50 – 75% (кора сосны) и 65% (кора березы) от общего количества проантоцианидинов [7].

Таким образом, актуальным является изучение содержания неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов и выявление условий её исчерпывающей экстракции из лекарственного растительного сырья.

Для повышения выхода экстрактивных веществ и сокращения продолжительности экстракции применяют различные методы: гидродинамические режимы экстракционного процесса, использование поверхностно-активных веществ, химических промоторов, дробной экстракции органическими растворителями различной полярности.

Для повышения выхода проантоцианидинов нами предлагается термическая активация корневищ с корнями сабельника болотного.

Целью настоящей работы является исследование влияния условий термической обработки корневищ с корнями сабельника болотного на содержание биологически активных веществ и выявление условий исчерпывающей экстракции суммы проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Порошки корневищ с корнями сабельника болотного термостатировали при температуре 70 °С в течение различного времени. Порошки выдерживали в неукоренных пенициллиновых флаконах.

После проведения термической активации порошки корневищ с корнями сабельника болотного анализировали спектрофотометрическим методом (содержание экстрагируемой, неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов, суммы фенольных соединений) и методом тонкослойной хроматографии.

Количественное определение экстрагируемой суммы проантоцианидинов. Около 0,500 г порошка сырья помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 20,0 мл 70% спирта этилового, закрывали пробкой, взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивали и доводили до первоначальной массы 70% спиртом этиловым. Содержимое колбы центрифугировали в течение 10–15 мин со скоростью 2 – 3 тыс. об/мин. Полученное над сырьём извлечение отделяли.

0,10 мл полученного извлечения переносили в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,9 мл 70% спирта этилового, 0,20 мл железосодержащего реактива (2% раствор $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ в растворе 2М кислоты хлороводородной) и 6,0 мл 5% раствора кислоты хлороводородной концентрированной в *n*-бутаноле, присоединяли колбу к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Раствор охлаждали при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения такой же раствор без нагревания [8, 9].

Содержание экстрагируемой суммы проантоцианидинов (X, %) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (1):

$$X_n = \frac{A \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot A_{\text{лсн}}^{1\%}} \quad (1)$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;

V_1 – объем экстракта, мл (20,0);

V_2 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл (7,2);

V_3 – объем экстракта, взятый для определения, мл (0,10);

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

$A_{\text{лсн}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продукта реакции суммы проантоцианидинов с $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ и HCL корневищ с корнями сабельника болотного, равный 352.

Количественное определение неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов. После отделения полученного извлечения сырье промывали на фильтре 70% спиртом этиловым, остаток сырья переносили в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,20 мл железосодержащего реактива (2% раствор $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ в растворе 2М кислоты хлороводородной) и 6,0 мл 5% раствора кислоты хлороводородной концентрированной в *n*-бутаноле, присоединяли колбу к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Раствор охлаждали при комнатной температуре. После охлаждения раствора измеряли оптическую плотность при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения такой же раствор без нагревания [6].

Содержание неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов (X_n , %) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (2):

$$X_n = \frac{A \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot A_{\text{лсн}}^{1\%}} \quad (2)$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;

V_1 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл (6,2);

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

$A_{\text{лсн}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продукта реакции суммы проантоцианидинов с $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ и HCL корневищ с корнями сабельника болотного, равный 352.

Количественное определение суммы фенольных соединений. К 50 мкл извлечения (полученного для количественного определения экстрагируемой суммы проантоцианидинов) прибавляли 4,95 мл воды очищенной, раствор перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 279 нм, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную [10, 11].

Содержание суммы фенольных соединений (Y, %) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (3):

$$Y = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot A_{1\text{см}}^{1\%}}, \quad (3)$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;

V_1 – объем экстракта, мл (20,0);

V_2 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл (5,0);

V_3 – объем экстракта, взятый для определения, мл (0,05);

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения катехина при 279 нм, равный 144.

Исследование качественного состава.

Для изучения качественного состава извлечения из порошков корневищ с корнями сабельника болотного, подвергнутых термоактивации, наносили на пластинку «Сорбфил ПТСХ-В» в виде полос длиной 10 мм и шириной около 3 мм. Пла-

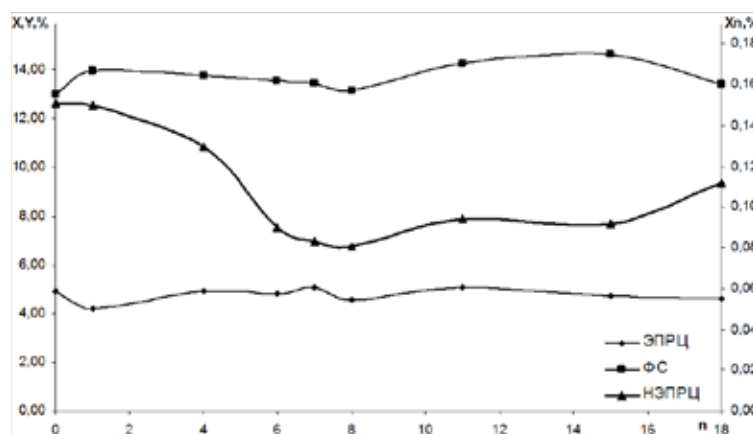
стинку хроматографировали в подвижной фазе, содержащей этилацетат – метанол – воду – кислоту муравьиную безводную (8,5:0,3:0,35:0,4, об/об/об/об), до прохождения фронта растворителей не менее 15 см от линии старта. Проявление проводили путем погружения хроматограммы в 0,5% водный раствор железа хлорида (III) и гексацианоферрата (III) калия. Хроматограмму вынимали из проявляющего реактива и давали стечь его избытку в течение 3 – 4 мин, высушивали при комнатной температуре и просматривали при дневном свете.

Оптимальную концентрацию проявляющего реактива подбирали экспериментально: исследовали концентрации исходных компонентов в пределах от 0,25 до 2%. Реактив готовили смешиванием равных объемов водных растворов железа (III) хлорида и гексацианоферрата (III) калия. Наилучшие результаты при минимальной окраске фона получили при концентрации проявляющего реактива, равной 0,5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При термической активации корневищ с корнями сабельника болотного одновременно протекают разнонаправленные процессы: деполимеризация проантоцианидинов до мономерных катехинов, экстракция содержащихся до термической активации в корневищах с корнями сабельника болотного фенольных соединений, дегградация (окисление) фенольных соединений в растворе.

На рисунке 1 представлены результаты



X, % (левая ось ординат) – экстрагируемая сумма проантоцианидинов;

Y, % (левая ось ординат) – сумма фенольных соединений;

Xn, % (правая ось ординат) – неэкстрагируемая сумма проантоцианидинов

Рисунок 1 – Влияние термической активации (70 °C) корневищ с корнями сабельника болотного на содержание биохимически активных веществ

количественного определения экстрагируемой суммы проантоцианидинов (ЭПРЦ), неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов (НЭПРЦ), суммы фенольных соединений (ФС) при термической активации (70 °C) корневищ с корнями сабельника болотного в течение 18 дней (n).

Оптимальным условием термической активации при температуре 70°C является термостатирование в течение 7 дней, при котором происходит снижение содержания в корневищах с корнями сабельника болотного неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов на 40%. Происходит постепенная деполимеризация высокомолекулярных проантоцианидинов с постепенным накоплением проантоцианидинов, имеющих более низкие степени полимеризации, которые являются более доступными для экстракции. Поэтому проведение термической активации порошков корневищ с корнями сабельника болотного позволяет увеличить степень извлечения высокомолекулярных проантоцианидинов.

Все порошки корневищ с корнями сабельника болотного, подвергнутых термической активации, исследовали методом тонкослойной хроматографии. На хроматограммах обнаруживали четыре зоны темно-синего цвета (фенольные соединения). При всех видах термической активации в качественном составе корневищ с корнями сабельника болотного изменений не происходит. Для примера, на рисунке 2 (см. обложку журнала) приведена хроматограмма извлечений порошков корневищ с корнями сабельника болотного без термической активации (проба 0) и подвергнутых термической активации при температуре 70°C в течение 1, 4, 6 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Термическая активация корневищ с корнями сабельника болотного в течение 7 дней позволяет извлекать сумму биологически активных веществ с увеличенным содержанием высокомолекулярных форм проантоцианидинов. Выявлены условия исчерпывающей экстракции суммы проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного.

Определены условия, при которых возможно проводить термическую активацию корневищ с корнями сабельника болотного без деградации проантоцианидинов.

SUMMARY

O.A. Yorshyk, G.N. Buzuk
THE INFLUENCE OF THERMAL
TREATMENT CONDITIONS OF RAW
MATERIAL ON EXTRACTION OF
PROANTHOCYANIDINS OF RHIZOMES
WITH ROOTS OF *COMARUM PALUSTRE* L.

The influence of thermal treatment of powders of rhizomes with roots of *Comarum palustre* L. on the content in them of the biologically active substances was studied. Holding the raw material at 70°C within 7 days leads to a decrease in content of rhizomes with roots of *Comarum palustre* L. of non-extractable proanthocyanidins by 40%. A gradual depolymerization of high-molecular rhizomes with roots of *Comarum palustre* L. with a gradual accumulation of proanthocyanidins having the lower degrees of polymerization down to the monomers that are more accessible for extraction is going on. Therefore, the conducting of thermal activation of powders of rhizomes with roots of *Comarum palustre* L. can increase the degree of extraction of high-molecular proanthocyanidins.

The thermal treatment of raw material does not lead to the qualitative change of proanthocyanidins of rhizomes with roots of *Comarum palustre* L.

Keywords: *Comarum palustre* L., proanthocyanidins, extractable and non-extractable proanthocyanidins.

ЛИТЕРАТУРА

1. Quantitative Determination of Extractable Condensed Tanins by HPLC for Comparison of Different Plant Species: review / R. Nørbæk [et al.] // Department of Food Sciencegy. – 18 p.

2. USDA Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods // Nutrient Data Laboratory Beltsville Human Nutrition Research Center Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture [Electronic resource]. – 2004. – Mode of access: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp.pdf>. – Date of access: 1.04.2005.

3. Спрыгин, В.Г. Природные олигомерные проантоцианидины – перспективные регуляторы метаболических нарушений / В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова // Вестник ДВО РАН. – 2006. – №2. – С. 81–90.

4. Procyanidin dimers and trimers from

grape seeds / J. Silva [et al.] // *Phytochemistry*. – 1991. – Vol. 30. – P. 1259-1264.

5. Rehwald, A. Analytical Investigation of *Crataegus* Species and *Passiflora incarnata* L. by High-Performance Liquid Chromatography / A. Rehwald // Swiss Federal Institute of Technology Zurich: Ph. D. thesis. – Switzerland, 1995.

6. Ёршик, О.А. Определение неэкстрагируемой суммы проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного / О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук // Студенческая мед. наука XXI в.: мат. VIII Междунар. науч.-практич. конф., Витебск, 13–14 ноябр. 2008 г. / ВГМУ; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2008. – С. 501–503.

7. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks / S. Matthews [et al.] // *Phytochemistry*. – 1997. – Vol. 45 – N.2 – P. 405–410.

8. Ёршик, О.А. Количественное определение проантоцианидинов в сабельнике болотном *Comarum palustre* L. / О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук // Вестник фармации. – 2007. – № 4. – С. 10-17.

9. Сабельника болотного корневища с корнями / Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственно-

го растительного сырья / УП «Центр экспертизы и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: «Типография «Победа», 2008. – С. 414–416.

10. Чемесова, И.И. Определение содержания дубильных веществ в корневищах *Comarum palustre* L. и настойке из него спектрофотометрическим методом / И.И. Чемесова, Д.В. Чижилов // Растительные ресурсы. – 2004. – Вып. 3. – С. 122–129.

11. Жукова, О.Л. Фитохимическое изучение сабельника болотного, сухого экстракта на его основе и их стандартизация: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / О.Л. Жукова; Всерос. науч.-исслед. ин-т. лек. и аромат. растений. – М., 2007. – 21 с.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра фармакогнозии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8 (0212) 37-09-29,
Ёршик О.А.

Поступила 10.12.2013 г.

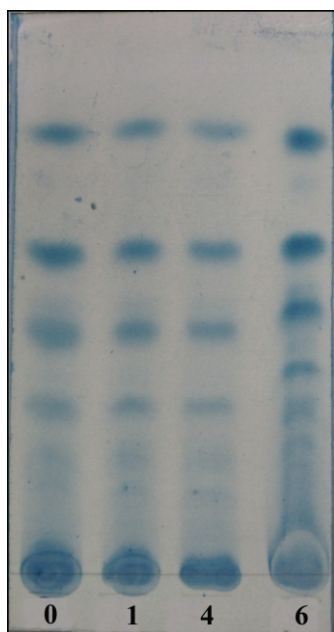


Рисунок 2 – Хроматограмма извлечений порошков корневищ с корнями сабельника болотного